

甲基-辅酶 M 还原酶结构、功能及催化机制研究进展

赖贞丽, 黄钢锋, 白丽萍

农业农村部沼气科学研究所 农业农村部农村可再生能源开发利用重点实验室, 四川 成都 610041

赖贞丽, 黄钢锋, 白丽萍. 甲基-辅酶 M 还原酶结构、功能及催化机制研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4147-4157.

Lai ZL, Huang GF, Bai LP. Advances of structure, function, and catalytic mechanism of methyl-coenzyme M reductase. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4147-4157.

摘要: 产甲烷古菌是目前发现唯一能产生甲烷气体的微生物,也是自然界中生物甲烷的主要贡献者。甲基-辅酶 M 还原酶 (Methyl-coenzyme M reductase, Mcr) 负责产甲烷代谢中最后一步甲烷的生成与甲烷氧化代谢中第一步甲烷的激活反应。该酶的基因高度保守,被广泛应用于古菌的鉴定与系统发育研究。其特殊的辅因子 F_{430} 及催化碳氢 (C-H) 键裂解的酶学机制也一直备受关注。近年来,在高分辨率蛋白结构和反应过渡态结构方面的重要突破有效地推动了 Mcr 结构与功能的研究。特别是最新发现的激活非甲烷烷烃厌氧降解的类甲基-辅酶 M 还原酶 (Mcr-like),引起了众多研究者对该类酶激活惰性烷烃分子机制的浓厚兴趣。因此,文中概述了 Mcr 结构、功能及催化机制的最新研究进展,包括新发现的 Mcr-like 的研究情况,并展望了 Mcr/Mcr-like 酶在烷烃厌氧氧化及温室气体控制方面的未来研究方向。

关键词: 产甲烷古菌, 甲基-辅酶 M 还原酶, 烷烃厌氧氧化, 蛋白结构, 催化机制

Advances of structure, function, and catalytic mechanism of methyl-coenzyme M reductase

Zhenli Lai, Gangfeng Huang, and Liping Bai

Key Laboratory of Development and Application of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Biogas Institute of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: Methanogens are unique microorganisms for methane production and the main contributor of the biogenic methane in atmosphere. Methyl-coenzyme M reductase (Mcr) catalyzes the last step of methane production in methanogenesis and the first step of methane activation in anaerobic oxidation of methane. The genes encoding this enzyme are highly conserved and are widely used as a marker in the identification and phylogenetic study of archaea. There has been a longstanding interest in its unique cofactor F_{430} and the underpinning mechanisms of enzymatic cleavage of alkane C-H bond.

Received: December 31, 2020; **Accepted:** March 10, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31970066), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, China (Nos. Y2020XC11, 1610012020002_03101).

Corresponding author: Liping Bai. Tel: +86-28-85228239; Fax: +86-28-85235478; E-mail: bailiping@caas.cn

国家自然科学基金 (No. 31970066), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (Nos. Y2020XC11, 1610012020002_03101) 资助。

网络出版时间: 2021-03-25

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20210322.1156.007.html>

The recent breakthroughs of high-resolution protein and catalytic-transition-state structures further advanced the structure-function study of Mcr. In particular, the recent discovery of methyl-coenzyme M reductase-like (Mcr-like) enzymes that activates the anaerobic degradation of non-methane alkanes has attracted much interest in the molecular mechanisms of C-H activation without oxygen. This review summarized the advances on function-structure-mechanism study of Mcr/Mcr-like enzymes. Additionally, future directions in anaerobic oxidation of alkanes and greenhouse-gas control using Mcr/Mcr-like enzymes were proposed.

Keywords: methanogens, methyl-coenzyme M reductase, anaerobic oxidation of alkanes, protein structure, catalytic mechanism

甲烷对农业生产、生态环境及社会经济发展都有重要的影响^[1]。一方面,它是一类重要的清洁能源^[1-2];另一方面,它也是一类强力的温室气体^[1-2]。产甲烷古菌是生物甲烷的主要生产者,也是地球微生物系统的重要组成部分,在碳素循环中扮演着重要的角色^[3]。在已知的所有产甲烷或甲烷厌氧氧化代谢中,甲烷的生成或氧化都是由甲基-辅酶 M 还原酶 (Methyl-coenzyme M reductase, Mcr) 催化的^[4-7]。该酶的基因高度保守,被广泛应用于古菌的鉴定与系统发育研究^[4-5,8-9]。自 2016 年以来,研究者陆续发现了一些能够厌氧氧化非甲烷烷烃 (如乙烷、丙烷、丁烷等) 未培养海洋古菌,又引起了人们对这类古菌新型烷烃厌氧氧化代谢的浓厚兴趣^[10-15]。其中,类甲基-辅酶 M 还原酶 (烷基-辅酶 M 还原酶, Mcr-like enzyme) 被认为是关键限速酶,催化烷烃碳氢 (C-H) 键的裂解^[10-15]。而认知和理解 Mcr/Mcr-like 对研究新型产甲烷代谢和烷烃厌氧氧化代谢都大有裨益。因此,本文从结构、功能及催化机制 3 个方面,结合本课题组当前的研究工作,概述了 Mcr/Mcr-like 的最新研究进展。

1 碳循环中的甲基-辅酶 M 还原酶

甲烷是一类强力的温室气体,也是地球碳素循环中的关键节点^[1]。全球每年产生约 1×10^9 t 甲烷,主要由产甲烷古菌代谢 CO_2/H_2 、乙酸和 C1/C2 甲基化合物生成;同时,约 1×10^8 t 甲烷又通过甲烷厌氧氧化代谢被氧化为 CO_2 释放进入大气,这两个过程都涉及 Mcr 这一核心功能酶 (图 1A)^[2,7,16-18]。

产甲烷古菌主要以发酵细菌或互营细菌分解

有机质产生的简单 C1/C2 化合物 (如 CO_2 、乙酸等) 作为底物进行产甲烷代谢来获取生长所需的能量 (图 1B)^[17-18]。根据底物的类型,通常将产甲烷代谢分为氢营养型、甲基营养型和乙酸营养型 3 大类^[17]。氢营养型产甲烷古菌不含有细胞色素,以 H_2 为电子供体,在一系列还原酶、转移酶和氢酶的催化下还原 CO_2 生成 CH_4 和 H_2O ^[18]。完整的代谢途径如图 1 所示:(1) 甲酰基-甲基呋喃脱氢酶 (Tungstopterin-dependent formylmethanofuran dehydrogenase, Fwd) 还原 CO_2 为甲酰基 (CHO-) 并负载于一碳载体甲烷呋喃 (Methanofuran, MFR) 生成 CHO-MFR^[19];(2) 甲酰基转移酶 (Formyltransferase, Ftr) 转移甲酰基到一碳载体四氢甲基蝶呤 (Tetrahydromethanopterin, H_4MPT) 生成 CHO- H_4MPT ^[20-21];(3) 环化水解酶 (Methenyl- H_4MPT cyclohydrolase, Mch) 催化 CHO- H_4MPT 脱水缩合形成次甲基-四氢甲基蝶呤 (Methenyl- H_4MPT^+ , $\text{CH}=\text{H}_4\text{MPT}^+$)^[22-23];(4) $\text{CH}=\text{H}_4\text{MPT}^+$ 经过两次还原反应转化为甲基 (Methyl- H_4MPT , $\text{CH}_3\text{-H}_4\text{MPT}$), 依次由 F_{420} 依赖型亚甲基-四氢甲烷蝶呤脱氢酶 (F_{420} -dependent methylene- H_4MPT dehydrogenase, Mtd)^[24] 和亚甲基-四氢甲基蝶呤还原酶 (Methylene- H_4MPT reductase, Mer) 催化完成^[25];(5) 甲基转移酶 (Methyltransferase, Mtr) 将 $\text{CH}_3\text{-H}_4\text{MPT}$ 的甲基转移到一碳载体辅酶 M (Coenzyme M, CoM-SH) 形成甲基-辅酶 M ($\text{CH}_3\text{-S-CoM}$), 并通过形成膜内外离子梯度来直接推动三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) 的合成^[26]。(6) Mcr 催化 $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ 与辅酶 B (Coenzyme B, CoB-SH) 生成终产物 CH_4 和异二

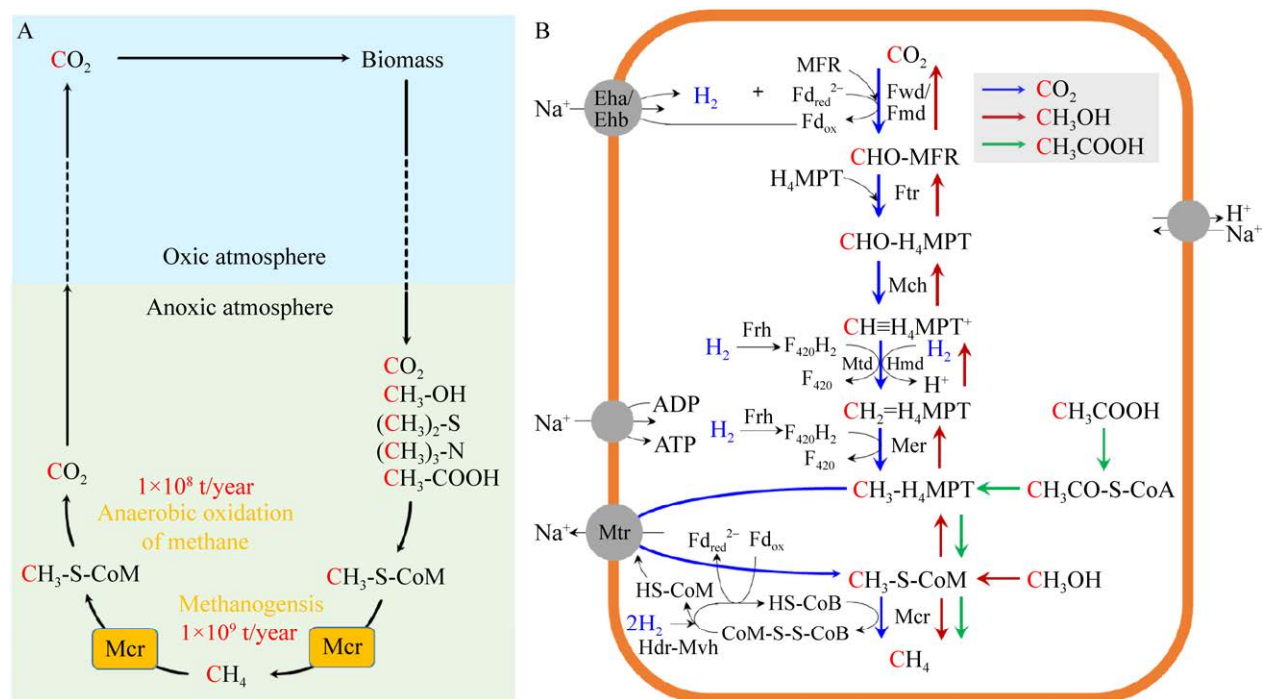


图 1 甲基-辅酶 M 还原酶 (Mcr) 在全球碳循环及产甲烷代谢中的定位示意图^[2,7,16-18,26]

Fig. 1 The location of methyl-coenzyme M reductase (Mcr) in the global carbon cycle and methanogenic pathways^[2,7,16-18,26]. (A) Mcr functions in the global carbon cycle as the key enzyme involved in methanogenesis and anaerobic oxidation of methane. (B) Mcr acts as the key enzyme in the final step of hydrogenotrophic, methylotrophic and acetoclastic methanogenesis.

硫化物 (Heterodisulfide, CoB-S-S-CoM)^[26]。后者在异二硫化物还原酶/[NiFe]-氢酶复合体 (Heterodisulfide reductase/[NiFe]-hydrogenase, Hdr-Mvh) 的作用下通过电子歧化机制再次还原为 CoM-SH 与 CoB-SH^[27]。

甲基营养型和乙酸营养型途径都存在于含细胞色素的产甲烷古菌中^[28]。甲基营养型主要存在于甲烷八叠球菌属 (*Methanosarcina*) 和甲烷球形菌属 (*Methanospiraera*)，利用甲醇、甲胺、甲硫醚等简单甲基化合物进行生长代谢^[29-30]。其特点在于代谢的起始过程：甲基在底物特异性甲基转移酶的催化下从甲基化合物转移至辅酶 M 生成甲基-辅酶 M (CH₃-S-CoM)，从而进入产甲烷代谢^[29-30]。自然界中仅有 *Methanosarcina* 和 *Methanosaeta* 以乙酸盐作为底物进行乙酸营养型产甲烷代谢^[29-30]。首先，乙酸被活化为乙酰辅酶 A (Acetyl coenzyme A,

Acetyl-CoA) 并消耗一个 ATP^[29-30]；然后，由一氧化碳脱氢酶/乙酰辅酶 A 合成酶复合体 (Carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, CODH/ACS) 催化甲基从乙酰辅酶 A 转移至一碳载体四氢甲基萨尔奇纳蝶呤 (Tetrahydrosarcinapterin, H₄SPT) 生成 CH₃-H₄SPT 进入产甲烷代谢，CO 基团被氧化生成 CO₂^[31-32]。

2 甲基-辅酶 M 还原酶的生物学功能

Mcr 催化的甲烷合成反应是整个产甲烷代谢的核心限速步骤^[33-36]。该酶以 CoB-SH 为电子供体，还原底物甲基-辅酶 M (CH₃-S-CoM) 生成 CH₄ (图 2)，是产甲烷古菌的特征反应^[33-36]。不同于产甲烷古菌代谢 C1/C2 化合物生产甲烷以获取能量，厌氧甲烷氧化古菌 (Archaeal anaerobic methane oxidizers, ANMEs) 厌氧氧化甲烷进行生

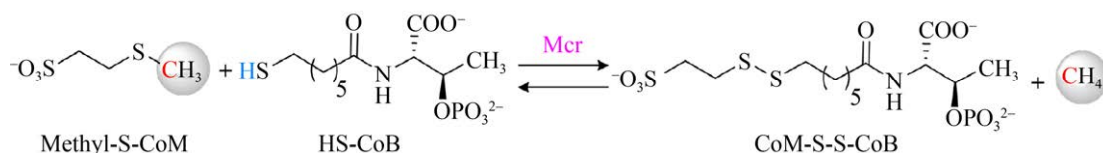


图2 Mcr 催化 CH_4 生成的化学反应^[34-36]

Fig. 2 CH_4 -forming reaction catalyzed by Mcr^[34-36].

长代谢^[37-41]。其代谢过程为产甲烷代谢的逆向途径^[37-41]，并通过与硫酸盐/硝酸盐还原菌进行互营生长以克服热力学能障 ($\Delta G^0 = +30 \text{ kJ/mol}$)^[37-41]。Mcr 也作用于甲烷厌氧氧化代谢的第一步激活反应，即催化甲烷生成的逆反应^[37-41]。

Mcr 是一个多亚基酶复合体，*mcrA*、*mcrB* 和 *mcrG* 基因分别编码 α -、 β -和 γ -亚基^[42-43]。*mcr* 基因簇中的 *mcrC* 和 *mcrD* 基因尚不清楚其功能^[42-43]。其中，编码 α -亚基的 *mcrA* 基因是高度保守的，将作为产甲烷古菌系统发育研究中的特征基因^[42-43]。典型的 Mcr 酶复合体呈 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 构象，其活性中心含有特殊的镍卟啉 F_{430} 辅因子^[42-43]。或许是为了弥补 Mcr 的低催化活性，它在细胞中的表达量可达胞质总蛋白的 10% 左右^[42-44]。Mcr 一共有 Mcr I、Mcr II 和 Mcr III 三类同工酶^[45-49]。甲烷杆菌目 (Methanobacteriales) 和甲烷球菌目 (Methanococcales) 能够合成 Mcr I 和 Mcr II 两种同工酶，两者在结构上有 60%–70% 的相似度^[45-46]。有研究发现，在马尔堡甲烷热杆菌 *Methanothermobacter marburgensis* 中，这两种同工酶的表达水平受温度、pH、生长阶段等生长条件的调控^[45-46]。Mcr III 主要存在于 Methanococcales，包括生长快速的嗜热和超嗜热的海洋产甲烷古菌（如甲烷热球菌 *Methanothermococcus thermolithotrophicus* 和詹氏甲烷球菌 *Methanocaldococcus jannaschii*)^[47-48]。系统发育分析表明，编码 3 类不同 MCR 的基因都来自同一祖先，其中编码 Mcr I 和 Mcr III 的基因簇都含有 5 个基因 (*mcrBDCGA*)，而 MCR II 丢失了 1–2 个基因 (*mcrD* 或 *mcrC*)^[49]，但这并不影响其催化活性^[49]。

过去认为，Mcr 只存在于广古菌门 Methanobacteriales/Methanococcales/甲烷微菌目 Methanomicrobiales/甲烷火菌目 Methanopyrales/甲烷八叠球菌目 Methanosarcinales 五个目中，但近年来研究者在深古菌门和韦斯特古菌门中也发现了 *mcr* 基因簇^[4,11]。组学技术的发展与广泛应用，使得 Mcr 在更多的未培养古菌中被发现，尤其是在进行烷烃厌氧氧化代谢的海洋古菌中分布十分广泛^[10-15]。虽然其生态分布不断拓展^[4,11,36]，但还未在古菌域以外的微生物中发现，也表明了其在进化上具有一定的特殊性^[36]。

3 甲基-辅酶 M 还原酶的结构特性

1997 年，Ermler 等首次解析了 *M. marburgensis* Mcr I 复合体的三维结构，呈 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 构象，如图 3A 所示^[42]。在复合体中， α - β - γ -亚基和 α' - β' - γ' -亚基分别构成一个催化单元，两个催化中心呈对称排布，相距约 50 Å^[42]。其中，构成每个催化单元的 3 个亚基紧密互联形成一个长约 50 Å 的疏水性通道（从复合体表面到活性中心）^[42]。辅因子 F_{430} 位于该狭长通道的底部，其金属中心镍 (Ni) 呈 6 配位结构 (图 3A)^[42]。其中， α -谷氨酰胺 (Glutamine, Q) 147 和 α' -Q147 分别为 $(\alpha'\beta'\gamma')$ 和 $(\alpha\beta\gamma)$ 中的 Ni 中心提供第 5 个配位 (Ni 的下方)^[42]。Ni 中心的第 6 个配位是底物的结合位点，位于 Ni 的上方，在非反应状态下该配位由水分子占据^[42]。反应过程中，底物甲基-辅酶 M (Methyl-coenzyme M) 经此疏水通道到达 F_{430} 上方，硫 (S) 结合于 Ni 位点^[42]。如图 3B 所示，由于整个疏水性通道呈上宽下窄的狭长孔道，当第

2 个底物 CoB-SH 进入反应活性中心后将牢牢锁住进入活性中心的通道^[42,50]。

由于 Mcr 活泼的金属 Ni 活性中心, 目前未见活性状态的酶复合体晶体结构的报道^[41]。Mcr 催化中心金属 Ni 有 Ni(I)、Ni(II)、Ni(III) 三种氧化状态^[42-43] (图 3C), 但只有 Ni(I) 是活性价态^[42-43]。Ni(I) 极低的氧化还原电势 (Ni(II)/Ni(I) 为 -600 至 -700 mV) 极低^[51-52], 即使在严格厌氧的环境中 (比如在 95% N₂/5% H₂ 厌氧手套箱

进行酶蛋白复合体结晶) Ni(I)-F₄₃₀ 也很容易被快速氧化为 Ni(II)-F₄₃₀^[36]。从目前所获得的 Ni(II)、Ni(III) 状态的蛋白结构来看, 该酶在整体构象及催化活性中心的结构均高度相似^[36]。此外, 研究者也在甲烷氧化古菌中获得了 Mcr 的蛋白晶体结构, 发现其辅因子 F₄₃₀ 及活性位点的氨基酸存在部分修饰^[26,36,53-54], 可能与其执行甲烷氧化的功能相关^[26,36]。目前, 已经鉴定的 F₄₃₀ 结构有 9 种, 都是在 Ni 中心以外有部分的修饰, 但是功能未知^[36]。

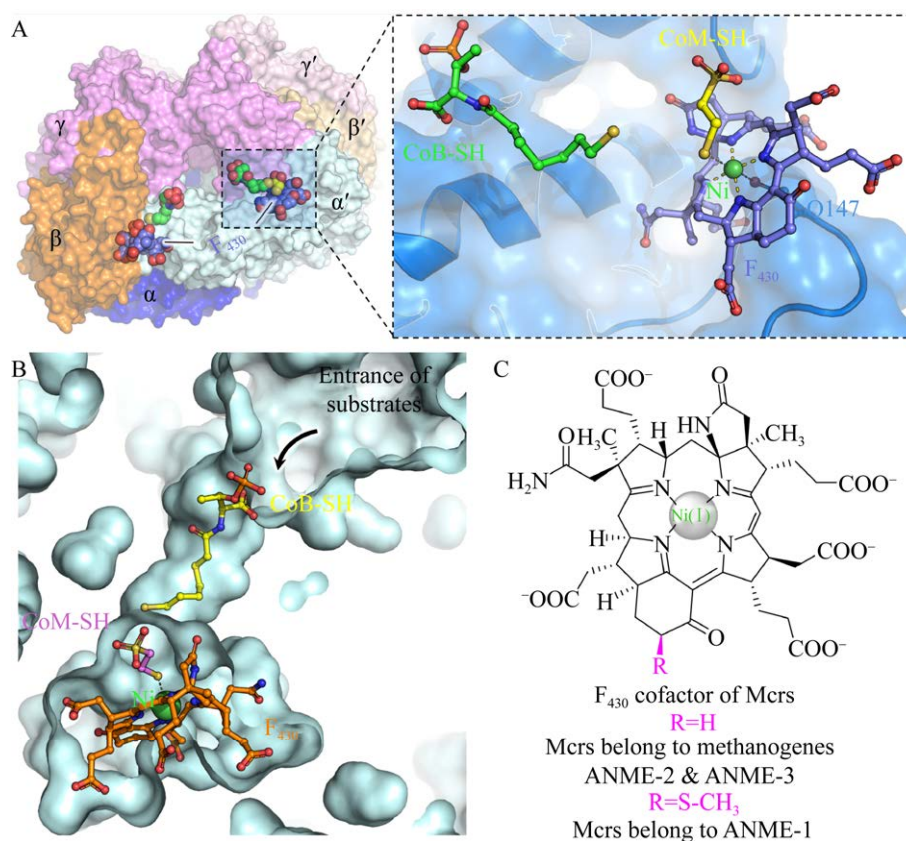


图 3 Mcr ($\alpha\beta\gamma$)₂ 复合体、活性中心疏水性通道及辅因子 F₄₃₀ 的结构示意图^[26,36,42-43,54]

Fig. 3 The structures of Mcr ($\alpha\beta\gamma$)₂ complex, hydrophobic channel within active center in Mcr and its cofactor F₄₃₀^[26,36,42-43,54]. (A) Overview structure of Mcr ($\alpha\beta\gamma$)₂ from *M. marburgensis*. The hetero-hexamers consists of two active centers in which harbors F₄₃₀ (purple), CoM-SH (yellow) and CoB-SH (green) (PDB code: 5A0Y). The only covalent bond of the Ni was Q147-O-Ni. The sixth coordination position of Ni was occupied by CoM-SH (yellow sticks). The electron donor CoM-SH (green sticks) located on the upper of the F₄₃₀ cofactor (purple sticks). (B) The hydrophobic channel (shown by light blue surface model) connected the protein surface and the deeply buried Ni site in which harbored F₄₃₀ (orange), CoM-SH (pink) and CoB-SH (yellow) (PDB code: 5A0Y). (C) The chemical structure of Mcr cofactor F₄₃₀ in methanogens/ANME-2/3 and ANME-1^[36].

4 甲基-辅酶 M 还原酶的催化机制

烷烃 C-H 键的裂解反应在化学上一直是一个很大的挑战^[55], 而 Mcr 能够克服热力学能障实现非活泼 C-H 键的厌氧裂解, 因此其催化机制一直以来备受关注^[34-36]。关于 Mcr 裂解 C-H 键的催化机理主要有两种假说^[34-36]。第一种假说基于 $MCR_{ox1-silent}$ 氧化态蛋白晶体结构的解析, 该假说认为活性 $F_{430-Ni(I)}$ 亲核进攻 $CH_3-S-CoM$ 的甲基 (CH_3), 从而形成 $CH_3-Ni(III)-F_{430}$ 中间过渡态复合物^[42]。随后, 中间过渡态复合物裂解产生甲烷 (CH_4) 和辅酶 M-巯基自由基 ($CoM-S\cdot$)^[42]。第二种假说在 $MCR_{ox1-silent}$ 氧化态蛋白晶体结构的基础上结合了密度泛函理论计算 (DFT), 提出了甲基自由基催化机制^[35]。如图 4 所示, 该假说认为活性 $F_{430-Ni(I)}$ 首先攻击 $CH_3-S-CoM$ 的硫 (S) 导致甲基自由基 ($CH_3\cdot$) 和 $CoM-S-Ni(II)-F_{430}$ 过渡态复合物的形成^[34-35,56]。随后, $CH_3\cdot$ 自由基夺取电子供体辅酶 B ($CoB-SH$) 巯基 (-SH) 上的氢原子 (H) 产生 CH_4 和辅酶 B 巯基自由基 ($CoB-S\cdot$)^[34-35]。伴随 CH_4 的释放, $CoB-S\cdot$ 与 $CoM-S-Ni(II)-F_{430}$ 形成异二硫化物自由基阴离子 ($[CoB-S-S-CoM]^-$)^[34-35]。最后, $CoB-S-S-CoM\cdot$ 的一个电子转移至 $Ni(II)-F_{430}$ 重新

形成 $Ni(I)-F_{430}$, 完成一个催化循环^[34-35]。近年来, 紫外/可见光谱 (Ultraviolet-visible spectroscopy, UV-Vis)、电子磁共振波谱 (Electron paramagnetic resonance spectroscopy, EPR)、圆二色谱 (Circular dichroism spectroscopy, CD) 等都相继检测到了中间过渡态复合物 $CoM-S-Ni(II)-F_{430}$, 有力地支持了第二种假说^[34-36]。另外, EPR 和 UV-Vis 的检测数据显示, Mcr 蛋白复合体的两个活性中心只有一个处于活性状态, 另一个是非活性的氧化状态^[26,35]。这一现象提示 Mcr 的两个活性中心可能是采用类似对置活塞式发动机的方式进行协同调控来完成催化反应^[57-58]。

目前的催化机制研究主要是基于 $MCR_{ox1-silent}$ 氧化态蛋白晶体结构分析和 DFT 计算, 完整催化机制的进一步揭示还需要更多的实验性证据来支撑 (比如获得 MCR_{red1} 还原态蛋白晶体结构)^[26,36,59]。当前, 冷冻电子显微镜技术已经日渐成熟, 特别是分辨率不断提升, 为在近生理状态下捕捉 Mcr 复合体的活性状态提供了有力的技术手段^[26,36,59]。同时, 相比于传统的 X-ray 晶体技术, 该技术将更是为捕捉 Mcr 催化过程的酶蛋白复合物构象的连续变化提供了契机^[26,36,59]。

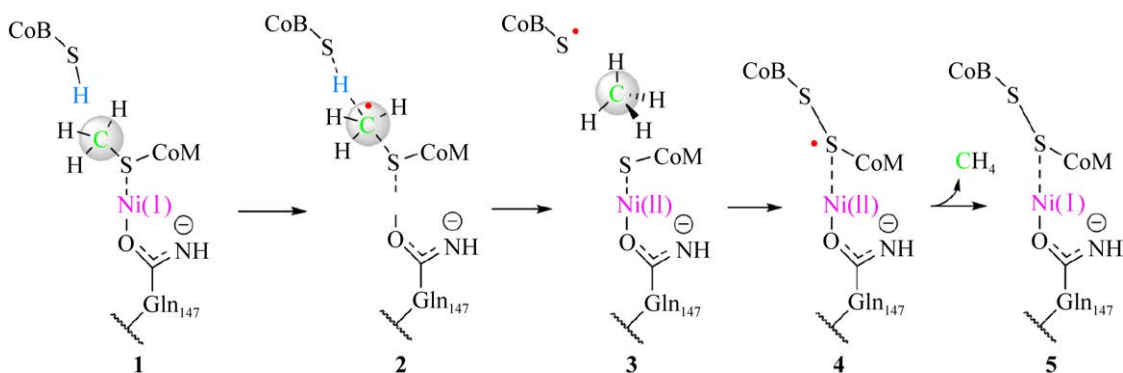


图 4 Mcr 的甲基自由基催化机制示意图^[26,34-36,59]

Fig. 4 The proposed methyl radical catalytic mechanism of Mcr^[26,34-36,59]. The reactive Ni(I) attacked the S of methyl-S-CoM (1). Producing a methyl radical and a Ni(II)-S-CoM intermediate (2). The methyl radical captured the H atom from the neighbored electron donor CoB-SH, generating a CH_4 and a CoB thiyl radical (3). A heterodisulfide thiyl radical was formed coupling with the release of CH_4 (4). The Ni(I) was regenerated by accepting one electron from the heterodisulfide thiyl radical (5). The radical was marked as a closed-red cycle. The Ni-center was covalently adhered via the Gln147 in Mcr protein (PDB code: 5A0Y)^[54].

5 甲基-辅酶 M 还原酶的翻译后修饰

Mcr 在结构上的显著特点是活性中心附近的氨基酸位点出现不同程度的翻译后修饰,但是功能不详^[26,36,60]。如图 5 所示,目前获得的高分辨 Mcr 蛋白晶体结构及质谱数据显示,大部分产甲烷古菌的 Mcr 存在 6 种氨基酸位点的修饰,包括硫代甘氨酸 (Thio-glycine)、1-N-甲基-组氨酸 (1-N-methyl-histidine)、S-甲基-半胱氨酸 (S-methyl-cysteine)、5-甲基-精氨酸 (5-methyl-arginine)、2-甲基-谷氨酸 (2-methyl-glutamine)、二氢天冬氨酸 (Didehydro-aspartate)^[26,36,54,60-61]。特别是硫代甘氨酸和 1-N-甲基-组氨酸这两种修饰高度保守,研究认为其与电子供体 CoB-SH 在催化活性中心的正确结合高度相关^[60-61]。研究者还在 *Methanoterris formicicus* 和 ANME-1 中还发现了 6-羟基色氨酸 (6-hydroxy-tryptophane) 和 7-羟基色氨酸 (7-hydroxy-tryptophane) 的修饰位点^[26,49,53]。目前报道的氨基

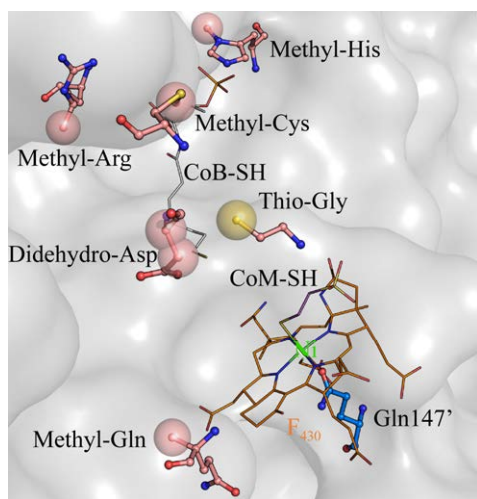


图 5 Mcr 活性中心氨基酸修饰示意图^[26,36,54]

Fig. 5 Modified amino acids in the active center of Mcr^[26,36,54]. Mcr from *M. marburgensis* contains the thio-glycine, 1-N-methyl-histidine, S-methyl-cysteine, 5-methyl-arginine, 2-methyl-glutamine, and didehydro-aspartate (highlighted by spheres)^[26,36]. Additionally, Mcr from *M. formicicus* and an ANME-1 archaeon contains 6- and 7-hydroxy-tryptophane, respectively^[26,49,53]. CoB-SH, CoM-SH and F₄₃₀ were shown as lines. Ni site bond to the protein via Gln147' shown by sticks and balls.

酸翻译后修饰位点都位于 McrA 亚基的活性中心区域,研究者推测它们很可能与催化反应的进行密切相关^[26,36,54]。最近,有研究者对负责甲基精氨酸、甲基半胱氨酸、硫代甘氨酸修饰的基因做了敲除,但是实验显示这些修饰位点的去除并未显著地影响 Mcr 的反应活性^[62-64]。当然,这并不排除其是否在特殊生理条件下发挥功能^[36]。2018 年, Lyu 等首次成功地完成了来源于甲烷热球菌 *Methanothermococcus okinawensis* 的 Mcr 复合体在海藻甲烷球菌 *Methanococcus maripaludis* 中的异源表达,并发现其在体内能自组装为完整的 Mcr 复合体^[65],这为将来通过定点突变来研究氨基酸位点修饰与催化机制包括进行定向改造提供了有力的技术手段。

6 类甲基-辅酶 M 还原酶

近年来有研究发现一些未培养海洋古菌能够代谢一些非甲烷气态短链烷烃(包括乙烷、丙烷和丁烷),它们通过类似 Mcr 的 Mcr-like 催化烷烃的起始厌氧降解^[10-15]。2016 年, Laso-Pérez 等在海底沉积层富集物中发现了未培养古菌 *Candidatus Syntrophoarchaeum* 能够厌氧降解丁烷^[14]。*Ca. Syntrophoarchaeum* 编码的 Mcr-like, 具有极高的表达量,代谢产物分析检测到关键中间代谢产物丁基-辅酶 M^[14]。研究者推测它是利用类似厌氧甲烷氧化的降解机制降解丁烷^[14]。2019 年, Chen 等在海洋烃渗漏区域富集物中发现了高丰度的未培养古菌 *Candidatus Argoarchaeum ethanivorans*, 该菌能够厌氧降解乙烷,含有编码 Mcr-like 的基因簇,并在蛋白提取物中检测到该 Mcr-like 的所有蛋白亚基^[15];同时,代谢产物分析也检测到关键中间代谢产物乙基-辅酶 M,推测该菌也是通过 Mcr-like 介导的途径进行乙烷的厌氧降解^[15]。随后, Laso-Pérez 等在烃渗漏区富集物中发现未培养古菌 *Candidatus Methanoliparia* 独立附着于油滴而生存,并且在全球大量的油气藏都检测到该菌的存在^[13]; *Ca. Methanoliparia* 的基因组信息显

示该菌能够编码完整的产甲烷代谢途径和古菌的烷烃厌氧降解途径,包括负责甲烷产生的 Mcr 和负责烷烃激活的 Mcr-like,推测该菌不仅能激活烷烃的厌氧降解,还能将中间产物用于产甲烷代谢产甲烷^[13]。

目前,我们的研究团队也在胜利油田的深层地下油田环境中获得了具有厌氧石油烃降解能力的产甲烷古菌 *Candidatus Methanoliparum* sp.高度富集物(未发表)。有意思的是该 *Ca. Methanoliparum* sp.具备两个重要的特性:一是它能够厌氧降解长碳链的烷烃,如 C16-C20 系列的烷烃,这是继 C2-C4 烷烃厌氧降解后的首次发现(未发表);二是它具备独立降解长碳链的烷烃,并能将其完全转化为甲烷和 CO₂,不同于已发现的非甲烷气态短链烷烃降解型古菌需要硫酸盐/硝酸盐还原菌的协助共同完成烷烃的完全降解(未发表)。通过宏组学和代谢产物分析,我们发现该菌的长链烷烃的厌氧降解也是由 Mcr-like 激活并驱动的,具备 Mcr-like 依赖性的烷烃激活代谢模块、脂肪酸 β 氧化和产甲烷代谢模块(未发表),这使其能够克服热力学能障并平衡胞内还原力而独立完全降解烷烃。

近年来,研究者非常关注这些来自油污区的海洋古菌,它们能厌氧氧化乙烷、丙烷、丁烷等,其基因组均含有 *mcr* 和 *mcr-like* 基因簇^[10-15]。遗憾的是这些新型海洋古菌的分离极具挑战性,目前还没有获得纯培养物,无法进行更为深入的研究。目前对 Mcr-like 的研究也仅仅停留在基因、生理水平,还未对其结构、功能、催化机理进行深入的解析。从报道来看,无论是甲烷氧化型古菌,还是新发现的乙烷/丙烷/丁烷氧化型古菌,包括我们正在研究的长链烷烃氧化型古菌 *Ca. Methanoliparum* sp.(对于碳链的长度有很大的偏好性),都有极强的底物选择性^[10-15,36]。或许通过对新古菌来源的 Mcr/Mcr-like 蛋白结构及催化机制的研究能回答 Mcr/Mcr-like 是如何调控自身的双向催化功能

(还原或氧化)?为何有如此强的底物特异性?是如何调控的?

7 总结与展望

从 Mcr 的首次发现至今已经 50 余年,但研究者对它的研究热情一直不减^[26,36]。特别是最新发现催化烷烃 C-H 键厌氧氧化的 Mcr-like,更是掀起了对该类酶特殊 C-H 键裂解机理的研究热潮^[10-15,66]。为了能够将 Mcr/Mcr-like 应用于生物采油、油气转换或温室气体排放控制等,结合最新的生物物理、基因编辑、定向进化与量子计算等技术对其结构、功能和反应机理的进一步深入研究仍十分必要^[26,36]。就现阶段而言,以下几个方面的问题亟需解决:(1) Mcr/Mcr-like 还原态(活性状态)的蛋白结构的获取,这是研究其催化机制及底物偏好性(代谢不同碳链长度烷烃)的基础。目前分辨率不断提升的冷冻电子显微镜技术^[67-68]有望解决这一难题。(2) 高效且易操作的产甲烷古菌遗传操作系统的建立,这是研究其转录后修饰及人工改造的基础。目前的新型基因编辑技术^[69-70]有望解决这一难点。(3) 从富集物中获得新型烷烃厌氧氧化古菌的纯培养物,这是研究这类新型古菌代谢途径及 Mcr-like 生理功能的基础。目前基于膜扩散、微流控及细胞分选的新型培养技术^[71]有望解决这一问题。

REFERENCES

- [1] Lyu Z, Shao NN, Akinyemi T, et al. Methanogenesis. *Curr Biol*, 2018, 28(13): R727-R732.
- [2] Haynes CA, Gonzalez R. Rethinking biological activation of methane and conversion to liquid fuels. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(5): 331-339.
- [3] Offre P, Spang A, Schleper C. Archaea in biogeochemical cycles. *Annu Rev Microbiol*, 2013, 67: 437-457.
- [4] Hua ZS, Wang YL, Evans PN, et al. Insights into the ecological roles and evolution of methyl-coenzyme M reductase-containing hot spring Archaea. *Nat*

- Commun, 2019, 10: 4574.
- [5] Makogon YF. Natural gas hydrates—a promising source of energy. *J Natl Gas Sci Eng*, 2010, 2(1): 49-59.
- [6] Timmers PHA, Welte CU, Koehorst JJ, et al. Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic archaea. *Archaea*, 2017, 2017: 1654237.
- [7] Thauer RK, Kaster AK, Seedorf H, et al. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(8): 579-591.
- [8] Wagner A, Whitaker RJ, Krause DJ, et al. Mechanisms of gene flow in archaea. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(8): 492-501.
- [9] Evans PN, Boyd JA, Leu AO, et al. An evolving view of methane metabolism in the archaea. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(4): 219-232.
- [10] Wang YZ, Wegener G, Hou JL, et al. Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of archaea. *Nat Microbiol*, 2019, 4(4): 595-602.
- [11] Wang YZ, Wegener G, Ruff SE, et al. Methyl/alkyl-coenzyme M reductase-based anaerobic alkane oxidation in archaea. *Environ Microbiol*, 2020, 23(2): 530-541.
- [12] Hahn CJ, Laso-Pérez R, Vulcano F, et al. “*Candidatus* Ethanoperedens” a thermophilic genus of archaea mediating the anaerobic oxidation of ethane. *mBio*, 2020, 11(2): e00600-20.
- [13] Laso-Pérez R, Hahn C, Van Vliet DM, et al. Anaerobic degradation of non-methane alkanes by “*Candidatus* Methanoliparia” in hydrocarbon seeps of the gulf of Mexico. *mBio*, 2019, 10(4): e01814-19.
- [14] Laso-Pérez R, Wegener G, Knittel K, et al. Thermophilic archaea activate butane via alkyl-coenzyme M formation. *Nature*, 2016, 539(7629): 396-401.
- [15] Chen SC, Musat N, Lechtenfeld OJ, et al. Anaerobic oxidation of ethane by archaea from a marine hydrocarbon seep. *Nature*, 2019, 568(7750): 108-111.
- [16] Enzmann F, Mayer F, Rother M, et al. Methanogens: biochemical background and biotechnological applications. *AMB Expr*, 2018, 8(1): 1-22.
- [17] Ferry JG. *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry & genetics*. Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2012.
- [18] Thauer RK. The Wolfe cycle comes full circle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(38): 15084-15085.
- [19] Wagner T, Ermler U, Shima S. The methanogenic CO₂ reducing-and-fixing enzyme is bifunctional and contains 46[4Fe-4S] clusters. *Science*, 2016, 354(6308): 114-117.
- [20] Donnelly MI, Wolfe RS. The role of formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase in methanogenesis from carbon dioxide. *J Biol Chem*, 1986, 261(35): 16653-16659.
- [21] Breitung J, Thauer RK. Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanosarcina barkeri* identification of N⁵-formyltetrahydromethanopterin as the product. *FEBS Lett*, 1990, 275(1/2): 226-230.
- [22] DiMarco AA, Donnelly MI, Wolfe RS. Purification and properties of the 5,10-methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Bacteriol*, 1986, 168(3): 1372-1377.
- [23] Te Brömmelstroet B, Hensgens C, Geerts W, et al. Purification and properties of 5,10-methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol*, 1990, 172(2): 564-571.
- [24] Hagemeyer CH, Shima S, Thauer RK, et al. Coenzyme F₄₂₀-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Mtd) from *Methanopyrus kandleri*: a methanogenic enzyme with an unusual quaternary structure. *J Mol Biol*, 2003, 332(5): 1047-1057.
- [25] Aufhammer SW, Warkentin E, Ermler U, et al. Crystal structure of methylenetetrahydromethanopterin reductase (Mer) in complex with coenzyme F₄₂₀: architecture of the F₄₂₀/FMN binding site of enzymes within the nonprolyl *cis*-peptide containing bacterial luciferase family. *Protein Sci*, 2005, 14(7): 1840-1849.
- [26] Shima S, Huang GF, Wagner T, et al. Structural basis of hydrogenotrophic methanogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 2020, 74: 713-733.
- [27] Wagner T, Koch J, Ermler U, et al. Methanogenic heterodisulfide reductase (HdrABC-MvhAGD) uses two noncubane [4Fe-4S] clusters for reduction. *Science*, 2017, 357(6352): 699-703.
- [28] Thauer RK, Kaster AK, Goenrich M, et al. Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage. *Annu Rev Biochem*,

- 2010, 79: 507-536.
- [29] Conrad R. Importance of hydrogeno-trophic, acetoclastic and methylotrophic methanogenesis for methane production in terrestrial, aquatic and other anoxic environments: a mini review. *Pedosphere*, 2020, 30(1): 25-39.
- [30] Söllinger A, Urich T. Methylotrophic methanogens everywhere—physiology and ecology of novel players in global methane cycling. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(6): 1895-1907.
- [31] Adam PS, Borrel G, Gribaldo S. Evolutionary history of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, one of the oldest enzymatic complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(6): E1166-E1173.
- [32] Cohen SE, Can M, Wittenborn EC, et al. Crystallographic characterization of the carbonylated a-cluster in carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *ACS Catalysis*, 2020, 10(17): 9741-9746.
- [33] Ragsdale SW. Biochemistry of methyl-coenzyme M reductase: the nickel metalloenzyme that catalyzes the final step in synthesis and the first step in anaerobic oxidation of the greenhouse gas methane//Kroneck P, Torres M, Eds. *The Metal-Driven Biogeochemistry of Gaseous Compounds in the Environment*. Dordrecht: Springer, 2014: 125-145.
- [34] Shima S. The biological methane-forming reaction: mechanism confirmed through spectroscopic characterization of a key intermediate. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55(44): 13648-13649.
- [35] Wongnate T, Sliwa D, Ginovska B, et al. The radical mechanism of biological methane synthesis by methyl-coenzyme M reductase. *Science*, 2016, 352(6288): 953-958.
- [36] Thauer RK. Methyl (Alkyl)-coenzyme M reductases: nickel F-430-containing enzymes involved in anaerobic methane formation and in anaerobic oxidation of methane or of short chain alkanes. *Biochemistry*, 2019, 58(52): 5198-5220.
- [37] Hallam SJ, Putnam N, Preston CM, et al. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science*, 2004, 305(5689): 1457-1462.
- [38] Krüger M, Meyerdierks A, Glöckner FO, et al. A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature*, 2003, 426(6968): 878-881.
- [39] Michaelis W, Seifert R, Nauhaus K, et al. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science*, 2002, 297(5583): 1013-1015.
- [40] Nauhaus K, Boetius A, Krüger M, et al. *In vitro* demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environ Microbiol*, 2002, 4(5): 296-305.
- [41] Hallam SJ, Girguis PR, Preston CM, et al. Identification of methyl coenzyme M reductase A (mcrA) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(9): 5483-5491.
- [42] Ermler U, Grabarse W, Shima S, et al. Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science*, 1997, 278(5342): 1457-1462.
- [43] Shima S, Goubeaud M, Vinzenz D, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of methyl-coenzyme M reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Biochem*, 1997, 121(5): 829-830.
- [44] Goubeaud M, Schreiner G, Thauer RK. Purified methyl-coenzyme-M reductase is activated when the enzyme-bound coenzyme F₄₃₀ is reduced to the nickel(I) oxidation state by titanium(III) citrate. *Eur J Biochem*, 1997, 243(1/2): 110-114.
- [45] Bonacker LG, Baudner S, Thauer RK. Differential expression of the two methyl-coenzyme M reductases in *Methanobacterium thermoautotrophicum* as determined immunochemically via isoenzyme-specific antisera. *Eur J Biochem*, 1992, 206(1): 87-92.
- [46] Bonacker LG, Baudner S, Mörschel E, et al. Properties of the two isoenzymes of methyl-coenzyme M reductase in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Eur J Biochem*, 1993, 217(2): 587-595.
- [47] Huber H, Thomm M, König H, et al. *Methanococcus thermolithotrophicus*, a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Arch Microbiol*, 1982, 132(1): 47-50.
- [48] Jones WJ, Leigh JA, Mayer F, et al. *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch Microbiol*, 1983, 136(4): 254-261.

- [49] Wagner T, Wegner CE, Kahnt J, et al. Phylogenetic and structural comparisons of the three types of methyl coenzyme M reductase from *Methanococcales* and *Methanobacteriales*. *J Bacteriol*, 2017, 199(16): e00197-17.
- [50] Grabarse W, Mahlert F, Duin EC, et al. On the mechanism of biological methane formation: structural evidence for conformational changes in methyl-coenzyme M reductase upon substrate binding. *J Mol Biol*, 2001, 309(1): 315-330.
- [51] Jaun B. Coenzyme F₄₃₀ from methanogenic bacteria: oxidation of F₄₃₀ pentamethyl ester to the Ni(III) form. *Helv Chim Acta*, 1990, 73(8): 2209-2217.
- [52] Jaun B, Pfaltz A. Coenzyme F₄₃₀ from methanogenic bacteria: reversible one-electron reduction of F₄₃₀ pentamethyl ester to the nickel (I) form. *J Chem Soc Chem Commun*, 1986, (17): 1327-1329.
- [53] Shima S, Krueger M, Weinert T, et al. Structure of a methyl-coenzyme M reductase from Black Sea mats that oxidize methane anaerobically. *Nature*, 2011, 481(7379): 98-101.
- [54] Wagner T, Kahnt J, Ermler U, et al. Didehydroaspartate modification in methyl-coenzyme M reductase catalyzing methane formation. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55(36): 10630-10633.
- [55] Francis C, Robert G. *Organic Chemistry*. 11th ed. New York: McGraw-Hill Science, 2020.
- [56] Pelmeshnikov V, Blomberg MRA, Siegbahn PEM, et al. A mechanism from quantum chemical studies for methane formation in methanogenesis. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(15): 4039-4049.
- [57] Goenrich M, Duin EC, Mahlert F, et al. Temperature dependence of methyl-coenzyme M reductase activity and of the formation of the methyl-coenzyme M reductase red2 state induced by coenzyme B. *J Biol Inorg Chem*, 2005, 10(4): 333-342.
- [58] Ebner S, Jaun B, Goenrich M, et al. Binding of coenzyme B induces a major conformational change in the active site of methyl-coenzyme M reductase. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(2): 567-575.
- [59] Huang GF, Wagner T, Ermler U, et al. Methanogenesis involves direct hydride transfer from H₂ to an organic substrate. *Nat Rev Chem*, 2020, 4(4): 213-221.
- [60] Chen H, Gan QL, Fan CG. Methyl-coenzyme M reductase and its post-translational modifications. *Front Microbiol*, 2020, 11: 578356.
- [61] Selmer T, Kahnt J, Goubeaud M, et al. The biosynthesis of methylated amino acids in the active site region of methyl-coenzyme M reductase. *J Biol Chem*, 2000, 275(6): 3755-3760.
- [62] Deobald D, Adrian L, Schöne C, et al. Identification of a unique radical SAM methyltransferase required for the sp³-C-methylation of an arginine residue of methyl-coenzyme M reductase. *Sci Rep*, 2018, 8: 7404.
- [63] Nayak DD, Liu AD, Agrawal N, et al. Functional interactions between posttranslationally modified amino acids of methyl-coenzyme M reductase in *Methanosarcina acetivorans*. *PLoS Biol*, 2020, 18(2): e3000507.
- [64] Nayak DD, Mahanta N, Mitchell DA, et al. Post-translational thioamidation of methyl-coenzyme M reductase, a key enzyme in methanogenic and methanotrophic archaea. *Elife*, 2017, 6: e29218.
- [65] Lyu Z, Chou CW, Shi H, et al. Assembly of methyl coenzyme M reductase in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *J Bacteriol*, 2018, 200(7): e00746-17.
- [66] Singh R, Guzman MS, Bose A. Anaerobic oxidation of ethane, propane, and butane by marine microbes: a mini review. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2056.
- [67] De Oliveira TM, Van Beek L, Shilliday F, et al. Cryo-EM: the resolution revolution and drug discovery. *SLAS Discov: Advanc Sci Drug Discov*, 2020, 26(1): 17-31.
- [68] Nakane T, Kotecha A, Sente A, et al. Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature*, 2020, 587(7832): 152-156.
- [69] Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 2018, 361(6405): 866-869.
- [70] Gophna U, Allers T, Marchfelder A. Finally, archaea get their CRISPR-Cas toolbox. *Trends Microbiol*, 2017, 25(6): 430-432.
- [71] Lewis WH, Tahon G, Geesink P, et al. Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nat Rev Microbiol*, 2020. DOI: 10.1038/s41579-020-00458-8.

(本文责编 郝丽芳)